

## ReproFF

### Feeder Free Medium for Primate ES and iPS Cells

#### 取扱説明書

Cat.# RCHMD003: 100mL

#### 保存方法

本品は冷凍状態で発送されます。到着後すみやかに-20℃で保存して下さい。使用直前に解凍し、解凍後は2~8℃で保存して下さい。解凍後は2週間を目安に使い切して下さい。凍結融解は繰り返さないで下さい。

#### 特長

- ・フィーダー細胞なしで霊長類 ES 細胞の培養が可能です
- ・霊長類 ES 細胞用培地と基本構成が同じであるため、オンフィーダー培養からフィーダーレス培養(ReproFF)に簡単に移行できます。
- ・霊長類 ES 細胞への遺伝子導入・薬剤選択および、分化実験前の未分化維持に特に有効にお使いいただけます
- ・血清は不含です※

※ 動物由来のタンパク質を含みます

(注: 0.0008%の 2-Mercaptoethanol を含みます)

- ・全ロット、カニクイザル ES 細胞を用いて細胞培養検査を実施しています
- ・全ロット、浸透圧、pH、滅菌、マイコプラズマ検査を実施しています

#### 製品について

**本品は研究用ですので、治療診断目的には使用しないでください。また、本品を当社からの許可なしに第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。**

#### フィーダーレス培養の特徴

フィーダーレス培養では、オンフィーダー培養に比べ、細胞の形態が若干異なりますが問題ございません。また、増殖速度が低下する場合もありますので、その場合は継代間隔を長めに設定してください。

#### 使用方法

ReproFF および霊長類 ES 細胞用細胞剥離液を用いた霊長類 ES 細胞、ヒト iPS 細胞の継代方法

#### 必要なもの

- ・本品: ReproFF (使用前に室温にもどします。)
- ・bFGF: ReproFF に 5ng/mL の濃度で添加してください(bFGF を添加後は1週間を目安に使い切ってください。)
- ・霊長類 ES 細胞用剥離液(リプロセル社製 Cat. No. RCHETP002) (使用前に室温にもどします。)
- ・DMEM 等の基礎培地(血清不含)
- ・60 mm 細胞培養ディッシュ
- ・マトリゲル
- ・セルスクレーパー
- ・PBS (-): Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>-free PBS

- ・p-1000 ピペットマンとチップ
- ・その他培養操作に通常必要なもの

#### A: マトリゲコート

- ・マトリゲルの分注

A1、マトリゲルを冷蔵庫で一晩かけて解凍します。泡立たせないようにボトルを回して撹拌します。温度が上がるとゲル化するので注意して下さい。

A2、15mL チューブとチップを十分に冷やしておいて下さい。

A3、操作 1 で解凍したマトリゲルをゲル化させないように氷上で、15mL チューブに 300μL ずつ分注します。

A4、パラフィルムでシールし、-80℃で保存します。

- ・コーティング

A5、分注したチューブを冷蔵庫で一晩かけて解凍します。

A6、粘性はあるがゲル状のものが肉眼で見えないことを確認し、血清不含の培地(DMEM 等)を 8.7mL 加え 30 倍希釈します。泡立てないようにゆっくりピペティングします。

A7、30 倍希釈したマトリゲルを 60mm 細胞培養ディッシュに 1.5mL 加え、ピペットマンで全体にいきわたらせます。

A8、パラフィルム等でシールし、室温で 3 時間静置します。すぐに使用しない場合はそのまま 4℃で保存して下さい。

#### B: オンフィーダー培養→フィーダーレス培養への継代方法

(以下の試薬用量は、60 mm ディッシュの場合です。)

B1、ReproFF および霊長類 ES 細胞用細胞剥離液を室温にもどしておきます。

B2、操作 A5~A8 で準備したマトリゲルコートしたディッシュから余分な液体を取り除き、ReproFF を 4 mL 加えておきます。

B3、フィーダー細胞上で培養している霊長類 ES 細胞を用意します(60mm ディッシュ)。

B4、ES 細胞のディッシュから霊長類 ES 細胞用培地を除き、PBS(-) 2~3 mL で細胞を洗います。

B5、あらかじめ室温にもどした霊長類 ES 細胞用細胞剥離液 1mL をディッシュに加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、37℃、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 5 分程加温します。

B6、細胞の状態を顕微鏡で観察し、半分以上のコロニーがフィーダー細胞から剥がれかけている状態になっていることを確認します。注 1)

B7、新しい ReproFF を 2~3 mL 加え、ES 細胞とフィーダー細胞を全て剥がし 15 mL チューブに回収します。注 2)

B8、約 170 × g (1,000 rpm)、5 分間、室温で遠心します。

B9、上清をできるだけ除きます。(沈殿した細胞はフィーダー細胞と ES 細胞が絡まって塊となった状態になっています。)

B10、沈殿した細胞に新しい ReproFF を 1mL 加え、p-1000 ピペットマンのチップの先端をチューブの底部に軽く押し当て、細胞の塊をゆっくりと 2~3 回ピペティングします。するとフィーダー細胞と ES 細胞の塊がくずれ、ES 細胞のコロニーが塊から剥がれます。残ったフィーダー細胞の塊はすぐに沈むので、ピペットマンで取り除きます。注 3)

B11、再度、p-1000 ピペットマンのチップの先端をチューブの底部に軽く押し当て、塊から剥がれた ES 細胞のコロニーをゆっくりと 1~2 回ピペティングし、継代に適度な大きさのコロニーにします。注 4)

フィーダーレス培養を行う場合は大きめのコロニーで継代して下さい。大きさの目安は、目視で ES 細胞のコロニーが確認できる大きさです(図 1 参照)。

B12、懸濁した液の約 1/3 を、操作 B2 で準備したマトリゲルコートしたディッシュにまき、細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、37℃、CO<sub>2</sub> インキュベーターで一晩培養します。注 5)、注 6)

翌日から毎日 1 回の培地交換を行って下さい。培地交換の操作に関しては操作 D1,D2(後述)をご参照ください。

#### C:フィーダーレス培養→フィーダーレス培養への継代方法

フィーダーレス培養では、オンフィーダー培養に比べ増殖速度が低下する場合があります。その場合は、継代間隔を長めにしてES細胞のコロニーが十分大きくなるまで待って下さい。継代間隔は細胞株、継代時のコロニーの大きさにもよりますが、一般的に3～5日間程度です。

C1、ReproFF および霊長類ES細胞用細胞剥離液を室温に戻しておきます。

C2、操作 A5～A8 で準備したマトリゲルコートしたディッシュから余分な液体を取り除き、ReproFF を 4 mL 加えておきます。

C3、フィーダーレス培養中のディッシュから ReproFF を除き、PBS(-) 2～3 mL で細胞を洗います。

C4、あらかじめ室温にもどした霊長類 ES 細胞用細胞剥離液 1mL をディッシュに加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、37℃、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 5 分程加温します。

C5、新しい ReproFF を 2～3 mL 加え、セルスクレーパーで細胞を剥がし、15mL チューブに回収します。

C6、約 170 × g (1,000 rpm)、5 分間、室温で遠心します。

C7、上清をできるだけ除き、沈殿した細胞に新しい ReproFF を 1mL 加えます。p-1000 ピペットマンのチップの先端をチューブの底部に軽く押し当て、細胞の塊をゆっくりと 2～3 回ピペッティングします。細胞の塊をほぐし、コロニーを継代に適度な大きさにします。大きめのコロニーで継代して下さい。大きさの目安は、目視でES細胞のコロニーが確認できる大きさです(図 1)。細胞の塊が完全に崩れないこともありますが、無理に崩そうとすると、コロニーが小さくなってしまいますので、ご注意ください。

C8、懸濁した液の約 1/3 を、操作 C2 で準備したディッシュにまき、細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、37℃、CO<sub>2</sub> インキュベーターで一晩培養します。注 5)

翌日から毎日 1 回の培地交換を行って下さい。培地交換の操作に関しては操作 D1,D2(後述)をご参照ください。

#### D: 培地交換

必ず毎日1回行います。

D1、ReproFF を予め室温に戻しておきます。

D2、ディッシュ上の培地を取り除き、新しい ReproFF 4mL を加えてください。

#### フィーダーレス培養で細胞の状態が悪化した場合

フィーダーレス培養中に ES 細胞の状態が著しく悪化した場合は、操作 C6 の後、霊長類 ES 細胞用培地 (RCHEMD001、RCHEMD002) に細胞を懸濁し、約 1/3 をフィーダー細胞上にまきオンフィーダー培養を行ってみてください。オンフィーダー培養を数継代行くと状態が回復することがあります。

#### 細胞の凍結保存時の注意点

フィーダーレス培養中の ES 細胞は、霊長類 ES 細胞用凍結保存液 (RCHEFM001) で凍結保存することができます。ただし、オンフィーダー培養時に比べ、生存率が落ちる可能性がありますので、貴重な細胞の場合はフィーダーレス培養からオンフィーダー培養に戻し、数継代培養後に凍結保存していただくことをお勧めします。

#### ご注意)

1) 5 分以上放置してもコロニーがこのような状態にならない場合は、原因として試薬が室温にもどっていない、あるいは試薬が失活している可能性

があります。十分に室温にもどした新しい細胞剥離液をご使用ください。

2) 細胞の剥がれ方は、フィーダー細胞の密度や ES 細胞の状態によって異なる場合がありますが、基本的に ES 細胞とフィーダー細胞がともに剥がれます。

3) 残ったフィーダー細胞の塊をそのままにしておくと、剥がれた ES 細胞のコロニーが再度フィーダー細胞に絡まってしまうことがありますので、できる限り取り除いて下さい。

4) ピペッティングを行いすぎると、コロニーが小さくなりすぎてしまい、接着率や増殖効率の低下、細胞の状態の悪化等の原因にもなりますのでご注意ください。操作 B10 の段階で ES 細胞のコロニーが適度に小さくなっているようなら操作 B11 でのピペッティングは不要です。

5) 継代に用いる細胞の割合は、細胞株の増殖速度によっては変わるので、必要に応じて調整してください。

6) オンフィーダー培養からフィーダーレス培養への継代時に一部フィーダー細胞が混入しますが問題ございません。2 回目以降の継代時にフィーダー細胞は取り除かれます。

#### 関連商品

- ・霊長類 ES 細胞用培地 (500 mL、250mL Cat. No.RCHEMD001、002)
- ・霊長類 ES 細胞用細胞剥離液 (30 mL Cat. No.RCHETP002)
- ・霊長類 ES 細胞用凍結保存液 (25 mL Cat.No.RCHEFM001)
- ・フィーダー細胞 (SL10) (Cat.No.RCHEFC001、RCHEFC002)
- ・フィーダー細胞 (MEF) (Cat.No.RCHEFC003、RCHEFC004)

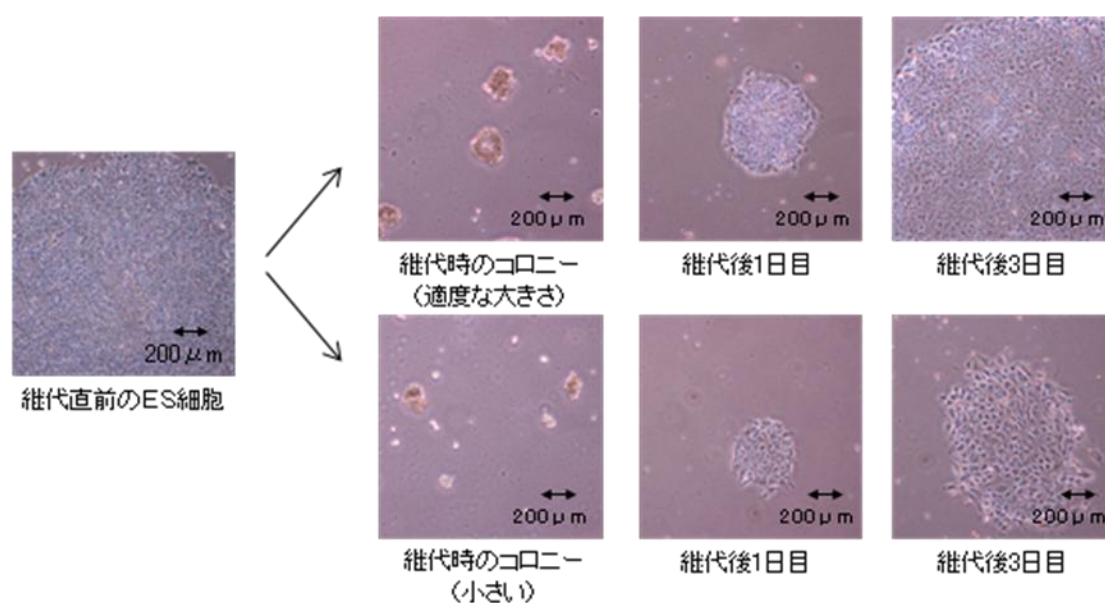
製造・販売元 (株)リプロセル

東京都港区白金台 3-16-13

白金台ウスイビル 7F

[www.reprocell.com](http://www.reprocell.com)

作成日 2008 年 10 月 20 日



〈図1〉継代時のコロニーを小さく崩し過ぎると〈下段〉、増殖率が遅くなり、コロニー内の細胞が密になりにくい傾向がみられるため、継代時は大きめのコロニー〈上段〉で継代するようにしてください。

## Feeder-Free Medium

### 霊長類ES細胞フィーダーレス培地 “ReproFF”



#### 品番

RCHEMD003 ReproFF, Feeder-Free Medium for Primate ES and iPS Cell (100 mL)

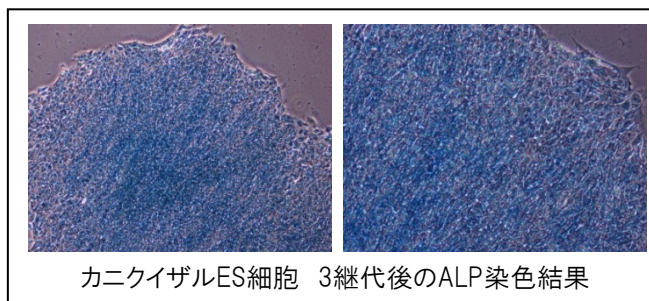
価格: 12,800円

#### 用途

ES細胞の遺伝子組換え実験による薬剤選択、動物への移植実験、分化検討など、フィーダー細胞なしでのES細胞の培養時にお使いいただけます。

#### 特徴

- ・血清不含です。
- ・弊社製品: 霊長類ES細胞用剥離液(RCHETP002)を用いることで、フィーダー細胞上での培養から簡単にフィーダーレス培養への移行が可能で、フィーダーレス培養中の継代も簡単に行うことができます。製品には詳細なプロトコールも添付しています。
- ・フィーダーレス培養からフィーダー細胞上への移行も簡単に行うことができます。
- ・ヒトES細胞で(KhES-1, KhES-3)、8継代(約1か月)までの未分化維持能を確認しております。(京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センターのご協力にて)
- ・カニクイザルES細胞で、10継代までの未分化維持能を確認しております。
- ・フィーダーレス培養後の心筋細胞への分化能を確認しております。



株式会社リプロセル

〒108-0071 東京都港区白金台3-16-13 白金台ウスイビル7階 Tel 03(5488)7077 Fax 03(5488)0021

URL: [www.reprocell.com](http://www.reprocell.com) e-mail: [info\\_repro@reprocell.com](mailto:info_repro@reprocell.com)

## ヒト胚性幹(ES)細胞を用いての培養評価

京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センターのご協力により、同研究所で樹立されたヒトES細胞株 (KhES-1, KhES-3)を用いて、ReproFF: Feeder Free Medium for Primate ES and iPS Cell (品番:RCHEMD003)の培養評価を行っていただきました。

### 評価方法

下記の条件により、8継代の培養を行い形態および培養速度などの観察を行った。

細胞株: KhES-1, KhES-3

継代数: 8回 (培養期間: 約1ヵ月)

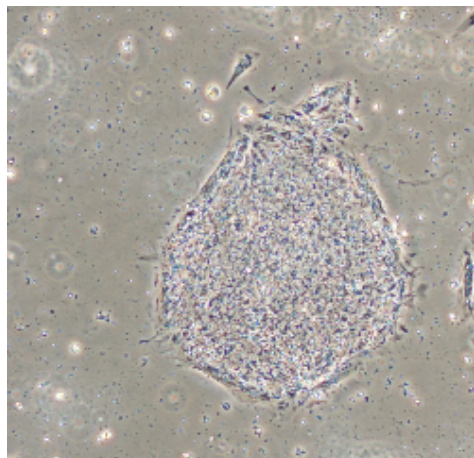
培地: ReproFF(リプロセル社, 品番RCHEMD003)に5ng/mL bFGFを添加

コーティング剤: マトリゲル

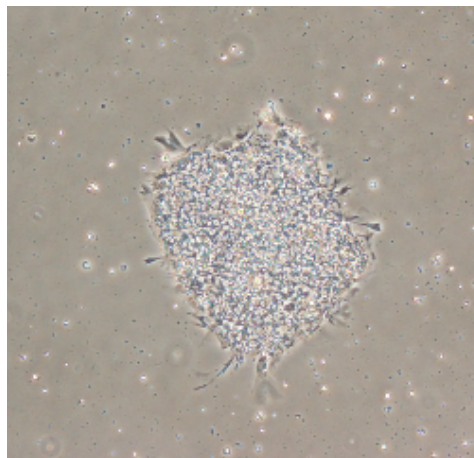
剥離液: 霊長類ES細胞用細胞剥離液(リプロセル社, 品番RCHETP002)

### 結果

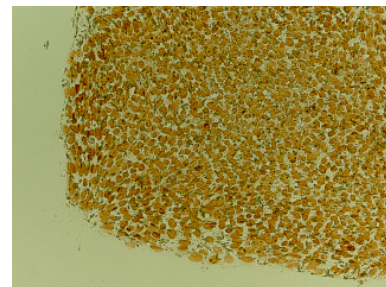
ReproFFでヒトES細胞、KhES-1, KhES-3細胞をマトリゲルコートした培養皿で培養した。細胞はやや扁平な形態をとるものの正常なES細胞としての形態を保持した。8継代行ったところで未分化マーカーの発現を調べたところアルカリフォスファターゼ、Oct-3/4の発現が認められた。



KhES-1の4継代後の写真



KhES-3の4継代後の写真



KhES-1の8継代後のOct-3/4染色の結果

(写真提供: 京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センター)

### 【販売元】



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル  
URL: <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)

TEL: (03) 5632-9610

FAX: (03) 5632-9619

TEL: (03) 5632-9620